



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 101 49 393 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 Q 1/68
A 61 K 48/00

DE 101 49 393 A 1

(21) Aktenzeichen: 101 49 393.2
(22) Anmeldetag: 28. 9. 2001
(43) Offenlegungstag: 24. 4. 2003

(71) Anmelder:

Lang, Florian, Prof. Dr.med., 72076 Tübingen, DE

(74) Vertreter:

Patentanwälte Ruff, Wilhelm, Beier, Dauster & Partner, 70174 Stuttgart

(72) Erfinder:

Lang, Florian, 72076 Tübingen, DE; Görlach, Agnes, 82194 Gröbenzell, DE

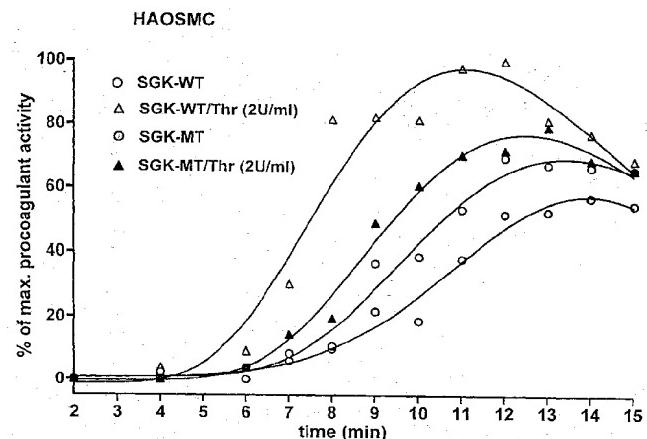
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 199 17 990 A1
DE 197 08 173 A1
EP 08 87 081 A2
WO 00 35 946 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) sgk1 als diagnostisches und therapeutisches target

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zum diagnostischen Nachweis von sgk1 (serum and glucocorticoid dependent kinase 1) sowie die Verwendung eines Wirkstoffes zur Beeinflussung von sgk1 für die therapeutische Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF (Tissue Factor) im Zusammenhang stehen, sowie ein diesbezügliches Diagnosekit.



DE 101 49 393 A 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zum diagnostischen Nachweis von sgk1 (serum and glucocorticoid dependent kinase 1) sowie die Verwendung eines Wirkstoffes zur Beeinflussung von sgk1 für die therapeutische Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF (Tissue Factor) im Zusammenhang stehen, sowie ein diesbezügliches Diagnosekit.

[0002] Eine Vielzahl von externen Signalen, denen eine Zelle in ihrer Umwelt ausgesetzt ist, führen zu intrazellulären Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungskaskaden, um eine schnelle und reversible Übertragung dieser Signale von der Plasmamembran und ihren Rezeptoren in das Zytoplasma und den Zellkern zu ermöglichen. Die Regulation einzelner Proteine, die an diesen Kaskaden beteiligt sind, ermöglicht erst die hohe Spezifität und Flexibilität der Zellen, die es ihnen erlauben, sehr schnell auf extrazelluläre Signale zu reagieren. An diesen Regulationsprozessen sind insbesondere Kinassen, d. h. Proteine, die eine Phosphatgruppe auf individuelle Substrate übertragen, beteiligt. Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (sgk) wurde ursprünglich aus Rattenmammakarzinomzellen kloniert (Webster MK, Goya L, Firestone GL, J. Biol. Chem. 268 (16): 11482–11485, 1993; Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL, Mol. Cell. Biol. 13 (4): 2031–2040, 1993). Die humane Kinase hsgk wurde als zellvolumenreguliertes Gen aus Leberzellen kloniert (Waldeger S, Barth P, Raber G, Lang F, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4440–4445, 1997). Es zeigte sich, daß die Rattenkinase (Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2514–2519, 1999; Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland Es, Aldrich G, Fejes-Toth G, J. Biol. Chem. 274: 16973–16978, 1999) den epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC) stimuliert. Weiter wurde gezeigt, daß eine gesteigerte Aktivität des ENaC mit Hypertonie einhergeht (Warnock DG, Kidney Ind. 53 (1): 1824, 1998).

[0003] In der DE 197 08 173 konnte gezeigt werden, daß die hsgk1 bei vielen Erkrankungen, die durch Zellvolumenänderung pathophysiologisch beeinflußt werden, wie beispielsweise Hypernatriämie, Hyponatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatische Encephalopathie und mikrobielle oder virale Infektionen, ein beträchtliches diagnostisches Potential besitzt.

[0004] In der DE 199 17 990 sind Kinase-Hemmstoffe, wie beispielsweise Staurosporin, Chelerythrin oder transdominant inhibitorische Kinase beschrieben worden, die bei der Therapie zellvolumenabhängiger Erkrankungen eingesetzt werden können.

[0005] Die hsgk wird auch im Gehirn exprimiert (Waldeger S, Barth P, Raber G, Lang F, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4440–4445, 1997), wo sie die spannungsabhängigen K⁺-Kanäle Kv1.3 reguliert. Es wurde gezeigt, daß diese K⁺-Kanäle des Kv1.3-Typs involviert sind in der Regulation der neuronalen Erregbarkeit (Pongs O, Physiol. Rev. 72: 69–88, 1992), der Regulation von Zellproliferation (Cahalan MD und Chandy KG, Cur. Opin. Biotech. 8 (6): 749–756, 1997) sowie der Regulation von apoptotischem Zelltod (Szabo I, Gulbins E, Apfel H, Zhan X, Barth P, Busch AE, Schlottmann K, Pongs O, Lang F, J. Biol. Chem. 271: 20465–20469, 1999; Lang F, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Siemen D, Gulbins E, News Physiol. Sci. 14: 194–200, 1999). Kv1.3 ist ferner wichtig bei der Regulation der Lymphozytenproliferation und -funktion (Cahalan MD und Chandy KG, Cur. Opin. Biotech. 8 (6): 749–756, 1997). Es wurden zwei weitere Mitglieder der sgk-Familie kloniert, die sgk2 und sgk3 (Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Co-

hen P, Biochem. J. 344: 189–197, 1999). Ferner zeigte sich, daß die sgk eine Serin-Threonin-Proteinkinase-Familie bilden, die transkriptionell und posttranskriptionell reguliert werden können. Wie die sgk1, werden auch die sgk2 und sgk3 durch z. B. Insulin und IGF1 über den PI3-Kinase-Weg aktiviert. Eine vollständige Charakterisierung der sgk Proteinfamilie hat aber bis jetzt nicht stattgefunden.

[0006] Dementsprechend stellt sich die Erfindung die Aufgabe, die sgk1 für neue diagnostische und therapeutische Anwendungen nutzbar zu machen.

[0007] Überraschenderweise konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von intakter sgk1 im Vergleich zur Expression von inaktiver sgk1 zu einer gesteigerten koagulatorischen Aktivität führt. Die Koagulation wurde in diesem experimentellen System durch den sogenannten Tissue Factor (TF) ausgelöst. Der TF ist ein 47 kDa-Transmembranglycoprotein, das als primäres Bindeglied zwischen vaskulären Zellen oder mononukleären Zellen und dem hemostatischen System dient. Dabei initiiert TF die Blutkoagulationskaskade (Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W, Biochemistry 30: 10363–10370, 1991). TF initiiert die Blutkoagulation durch Bindung an die Faktoren VII/VIIa mit hoher Affinität. Der daraus resultierende Komplex initiiert die Aktivierung der Faktoren IX und X mit der daran anschließenden Thrombingenerierung. Thrombin seinerseits katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, was zur Fibrineinlagerung und Blutgerinnung führt (Nemerson Y, Blood 71: 1–8, 1998).

[0008] Eine erhöhte Expression von TF ist nicht notwendigerweise mit einer erhöhten biologischen Aktivität von TF assoziiert. Funktionell aktives TF hängt von der Expression einer biologisch aktiven Form an der Zelloberfläche ab. In glatten Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells SMC) und Monozyten sind nur 10–20% des totalen zellulären TF an

35 der Zelloberfläche verfügbar, was auch die biologisch aktive Form darstellt, während das restliche TF in intrazellulären Pools (ungefähr 30%) und als latentes Oberflächen-TF (50–60%) vorliegt (Preissner KT, Nawroth PP, Kanse SM, J. Pathol. 190: 360–372, 2000; Schecter AD, Giesen PL, Tabby O, Rosenfeld CL, Rossikhina M, Tyfe BS, Kohtz DS, Fallon JT, Nemerson Y, Taubmann MB, J. Clin. Invest. 100: 2276–2285, 1997). Es konnte gezeigt werden, daß TF zusätzlich zu seiner koagulatorischen Wirkung (Ruef J, Hu ZY, Yin LY, Wu Y, Hanson SR, Kelly AB, Harker LA, Rao

45 Runge MS, Patterson C, Circ: Res.: 24–33, 1997) eine wichtige Rolle bei Metastasierung von Tumoren und bei der Angiogenese spielt (Lwaleed BA und Cooper AJ, Medical Hypotheses, 55: 470–473, 2000; Verheul HMW, Jorna AS, Hoekman K, Broxterman HJ, Gebbink MFBG, Pinedo HM, Blood: 4216–4221, 2000). Dadurch zeigen die gefundenen funktionellen Daten, daß die Wirkungen der sgk1 geeignet sind, die Expression und/oder Funktion von TF an der Zellmembran zu beeinflussen und damit mittelbar die Gerinnbarkeit des Blutes, die Anheftung von Tumorzellen mit folgender Metastasierung, die Angiogenese, sowie Erkrankungen, bei welchen Angiogenese eine Rolle spielt, zu beeinflussen. Durch Stimulierung der sgk1 kommt es zu einer gesteigerten Expression des Tissue Factors, durch Inhibierung der sgk1 zu einer verminderten Expression von aktivem Tissue Factor, und damit kann mittelbar stimulierend bzw. inhibierend auf die oben beschriebenen Indikationen eingewirkt werden.

[0009] Demzufolge wird die erfundungsgemäße Aufgabe durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche 1, 2, 3, 17 und 20 gelöst. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 4 bis 16, 18, 19, sowie 21 bis 26 genannt. Der Inhalt aller dieser Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

[0010] Erfindungsgemäß kann mindestens eine Substanz zum Nachweis der Expression und/oder der Funktion von sgk1 in eukaryotischen Zellen verwendet werden. Damit ist insbesondere auch eine Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen, möglich. Bei dieser Substanz könnte es sich z. B. um einen Antikörper handeln, der gegen sgk1 gerichtet ist, und in einem dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren, wie z. B. ELISA (enzyme-linked-immuno sorbent assay) eingesetzt werden kann. Bei solchen Immunoassays wird der gegen das zu bestimmende Antigen (sgk1) gerichtete spezifische Antikörper (bzw. bei Antikörperbestimmungen homologe Testantigene) an eine Trägersubstanz (z. B. Zellulose, Polystyrol) gebunden, an der sich nach der Inkubation mit der Probe Immunkomplexe bilden. In einem nachfolgenden Schritt wird diesen Immunkomplexen ein markierter Antikörper zugeführt. Durch Zugabe eines chromogenen Substrates zum Reaktionsansatz können die Immunokomplex-gebundenen Enzym-Substratkomplexe sichtbar gemacht bzw. die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt werden. Weitere Substanzen, die für den diagnostischen Nachweis verwendet werden können, sind sogenannte Oligonukleotide, die mit Hilfe der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignet sind, über ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden, einen quantitativen Nachweis von sgk1 zu erbringen. Weitere Verfahren, wie ein bekanntes Zielprotein quantitativ nachgewiesen werden kann, sind dem Fachmann geläufig.

[0011] Erfindungsgemäß wird ein Wirkstoff für die Beeinflussung, insbesondere die Inhibierung oder Aktivierung der Expression und/oder Funktion von sgk1 in eukaryotischen Zellen, zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen, beansprucht. Da sgk1, wie auch sgk2 und sgk3, eine Kinase ist, kommen insbesondere dem Fachmann bekannte Kinase-Inhibitoren, wie z. B. Staurosporin, Chelerythrin etc., aber auch andere Substanzen wie z. B. transdominant negative Kinase Mutanten, in Frage. Dem Fachmann sind solche Substanzen bekannt, und man kann sie aus kommerziellen (Sigma, Calbiochem, etc.) sowie nicht kommerziellen Quellen beziehen. Als Aktivatoren können z. B. gentechnisch veränderte Mutanten von sgk1, aber auch z. B. Inhibitoren von Phosphatasen, genutzt werden. Auch Phosphatase-Inhibitoren sind dem Fachmann bekannt, und sie sind ebenfalls zum Teil kommerziell (Sigma, Calbiochem, etc.) sowie nicht kommerziell erhältlich. Bei Einsatz von Phosphatasen-Inhibitoren würde die Dephosphorylierung inhibiert, und dadurch das von sgk1 aktivierte Target (TF) im aktivierte Zustand verbleiben. Bevorzugt werden diese Wirkstoffe zur Herstellung eines Medikamentes oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung genutzt.

[0012] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff gegen sgk1 selbst gerichtet. Es kann sich bei den Wirkstoffen z. B. um Antisensesequenzen, sogenannte kinase deficient mutants, aber auch um Kinaseinhibitoren, wie die weiter oben schon erwähnten Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. deren Analoga, handeln. Weiterhin kann der Wirkstoff auch ein sogenanntes "small molecular compound" bzw. ein Polynukleotid sein, welches für ein Peptid kodiert, das die Expression von sgk1 beeinflusst, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert.

[0013] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Wirkstoff gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk1 gerichtet. Diese Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/

oder biologische Vorläufer könnten up- und/oder downstream liegende Mitglieder der sgk1-Signaltransduktionskaskade, Transkriptionsfaktoren, die für den Expressionslevel von sgk1 verantwortlich sind, Proteasen, die für den proteolytischen Abbau von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk1, aber auch bis jetzt unbekannte Moleküle, sein, die durch den Wirkstoff beeinflusst werden und an der Expression und/oder Funktion von sgk1 beteiligt sind.

[0014] Erfindungsgemäß ist es möglich, bekannte sowie noch unbekannte Wirkstoffe zu verwenden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Wirkstoff, welcher gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischer Vorläufer von sgk1 gerichtet ist, ein sogenanntes "small molecular compound", insbesondere ein solches mit einem Molekulargewicht (MG) < 1.000. Small molecular compounds können z. B. Kinase-Inhibitoren, wie z. B. die Imidazol-Derivate SB 203580 (MG 377,4, oder auch SB 202190 (MG 331,3) sein, die beide bekannten Inhibitoren der Kinase-Expression sind und von Calbiochem kommerziell vertrieben werden.

[0015] Die Erfindung kann genutzt werden, um alle Formen von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen, zu behandeln. Insbesondere ist hierbei an Koagulopathien und/oder Angiopathien des angeborenen oder erworbenen Typs zu denken. Unter Koagulopathien werden allgemein Gerinnungsstörungen verstanden. Angeborene Koagulopathien (sogenannte Defektkoagulopathien) sind z. B. Dysfibrinogenämie, Hypoprokonvertinämie, Hämophilie B, Stuart-Prower-defect etc.. Erworbene Gerinnungsstörungen sind z. B. Prothrombin-Komplexmangel, Verbrauchs-Koagulopathie, Hyperfibrinolyse, Immunkoagulopathie sowie komplexe Koagulopathien. Beide Formen der Koagulopathien werden verursacht durch Mangel an oder Funktionsstörung von verschiedenen plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Entsprechend der unterschiedlichen Symptomatik werden Koagulopathien mit Blutungstendenz (Minuskoagulopathien) und Koagulopathien mit Thrombosetendenz (Plusagulopathien) sowie entsprechend dem Ort der Ursache hepatogene, kardiogene und Immunkoagulopathien unterschieden. Somit lässt sich durch Aktivierung bzw. Inhibierung von sgk1 die Gerinnungsbereitschaft des Blutes herabsetzen bzw. steigern, und somit der medizinischen Indikation anpassen. Ähnliche Überlegungen gelten auch für Angiopathien, d. h. Erkrankungen, die unter den Oberbegriff für Gefäßkrankheiten zusammengefasst werden, wie z. B. diabetische Angiopathie, diabetische Mikroangiopathie etc. Auch hierbei kann der Wirkstoff insbesondere dazu verwendet werden, angeborene und/oder erworbene Angiopathien zu behandeln.

[0016] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Wirkstoff zur Stimulierung oder Inhibierung der Angiogenese verwendet. Unter Angiogenese wird die Entwicklung von Gefäßwänden, z. B. während der Embryonalentwicklung verstanden, und eine Reihe von angiogenesabhängigen Erkrankungen sind dem Fachmann bekannt, so z. B. Diabetes Tumorbildung und Autoimmunerkrankungen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Wirkstoff zur Stimulierung oder Inhibierung der Wundheilung eingesetzt.

[0017] Die Erfindung betrifft auch ein Diagnosekit. Dieser umfaßt mindestens eine Substanz, die zum Nachweis von Expression und/oder Funktion von sgk1 geeignet ist, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen. Weiterhin können mit einem solchen Kit Erkrankungen diagnostiziert werden, die mit einer Über- oder Unterexpression bzw. -funktion von sgk1 verbunden sind. Gezielt können solche Diagnostika in

einem Diagnosekit eingesetzt werden, um unter anderem Erkrankungen, wie die weiter oben beschriebenen Koagulopathien, Angiopathien, angiogeneseabhängige Erkrankungen, Erkrankungen der Wundheilungen etc., nachzuweisen. Auch hierbei kann der Nachweis der Erkrankungen über den Nachweis einer gestörten Expression und/oder Funktion von sgk1 erfolgen. Insbesondere kann es sich bei dieser Substanz um eine solche handeln, die auf Nukleotid und/oder Peptid-Ebene bzw. Polynukleotid und/Polypeptid diesen Nachweis erbringt. Zu den weiteren Merkmalen einer solchen Substanz wird auf den entsprechenden bisherigen Text der Beschreibung Bezug genommen.

[0018] Die Erfindung umfaßt ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens einen Wirkstoff enthält, der die Expression und/oder Funktion von sgk1 beeinflußt, insbesondere inhibiert oder aktiviert, und vorzugsweise ggf. einen pharmazeutischen Träger. Dabei kann es sich bei dem Wirkstoff um einen Kinase-Inhibitor, wie die bereits weiter oben erwähnten Inhibitoren Staurosporin, Chelerythrin, SB 203580 und SB 202190 bzw. deren Analoga, aber auch andere Substanzen, handeln. Ferner kann es sich bei dem Wirkstoff um ein Polynukleotid handeln, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid kodiert, wobei dieses Peptid die Expression von sgk1 beeinflußt, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert. Ein Beispiel für ein erfundungsgemäßes Polypeptid ist ein sogenannter kinase deficient mutant. Weitere Beispiele, wie die Expression und/oder Funktion über gentechnisch veränderte Varianten des Target-Proteins beeinflußt werden kann, sind dem Fachmann geläufig, und können in einer Reihe von Lehr-/Fachbüchern sowie Anleitungen für die Laborarbeit (z. B. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laborator, 1996; Leonard G, Davis PhD, Michael W, Kuehl Md, James F, Battey MD. McGraw-Hill Professional Publishing, 1995) nachgelesen werden. Bei dem erfundungsgemäß Wirkstoff kann es sich ferner um einen sogenannten "small molecular compound" handeln, vorzugsweise um ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht ($MG < 1.000$). Ferner kann es sich bei dem Wirkstoff auch um eine sogenannte Antisensesequenz handeln, d. h. eine Sequenz, die in der Lage ist, mit der mRNA eine Doppelstrangduplex auszubilden, und dadurch die Translation eines Zielpolypeptids zu verhindern. Auch kann die Sequenz von sgk1 selbst genutzt werden, um eine Überexpression zu erzielen, z. B. durch Einbau in Vektoren oder Plasmiden, wobei vorher die Zielsequenz auch noch durch "Carrier"-Moleküle, z. B. Promotoren, modifiziert werden kann. Zu weiteren Merkmalen einer solchen Zusammensetzung wird auf den entsprechenden bisherigen Text der Beschreibung Bezug genommen.

[0019] Schließlich umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffes aufweist, der die Expression und/oder Funktion von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk1 beeinflußt, insbesondere inhibiert oder aktiviert. Vorzugsweise kann diese pharmazeutische Zusammensetzung ggf. auch einen pharmazeutischen Träger enthalten. Diese Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk1 können z. B. weitere Kinasen sein, die an der Regulation der Aktivität von sgk1 beteiligt sind, Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle spielen für den Expressionslevel von sgk1, sowie weitere bekannte oder bis jetzt unbekannte Mitglieder der sgk1 in einer Transduktionskaskade, sowie die weiter oben schon beschriebenen Moleküle. Auch Polynukleotide, die ein Peptid kodieren, welches die Expression von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk1 beeinflußt, vorzugsweise inhibiert oder akti-

viert, können in einer solchen Zusammensetzung enthalten sein. Auch sogenannte "small molecular compounds", die vorzugsweise ein Molekulargewicht ($MG < 1.000$) haben, und die gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk1 gerichtet sind, und dabei die Expression bzw. die Funktion dieser Kinase inhibieren oder aktivieren, sind einsetzbar. Zu weiteren Merkmalen eines solchen Wirkstoffes wird auf den entsprechenden bisherigen Text der Beschreibung Bezug genommen.

[0020] Die bestehenden Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen in Verbindung mit den Unteransprüchen und den Figuren. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

[0021] In den Abbildungen zeigen:

[0022] Fig. 1 Stimulation der prokoagulatorischen Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen.

Experiment

[0023] Aufgetragen ist die prokoagulatorische Aktivität in % des Maximalwertes gegen die Zeit nach Rekalzifizierung. Bei dem Experiment zu Fig. 1 wurde die prokoagulatorische Aktivität humarer glatter Gefäßmuskelzellen (HAOSMC) durch die Messung der Thrombinbildung während des Gerinnungsvorganges in rekalzifiziertem Blutplättchen-armen Plasma (PPP) gemessen (Beguin S, Lidhout T, Hemker HC: Thromb. Haemost. 61: 25–29, 1998). Dazu wurden konfluente glatte Gefäßmuskelzellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten, dann dreimal in HEPES-Tyrode-Lösung gewaschen, und dann mit humanem PPP inkubiert. Die Bildung von Thrombin wurde durch Zugabe von 16,7 mM $CaCl_2$ zum Inkubationsmedium ausgelöst. Jeweils 20 μl des Überstandes wurden alle ein bis zwei Minuten entnommen und darin die Thrombin-Bildung mit Hilfe des Farbstoffes S-2238 (Haemochrom Diagnostica) bestimmt. Die optische Dichte wurde in ein Spektrophotometer (Uvikon, Controninstruments) bei 405 nm bestimmt. Die Abhängigkeit der oberflächenprokoagulatorischen Aktivität von glatten Muskelzellen von der Verfügbarkeit des membrangebundenen Tissue Factors wurde durch neutralisierende Antikörper gegen den humanen Tissue Factor nachgewiesen (Mab# 4508; American Diagnostica; 10 $\mu g/ml$ 20 Minuten vor der Rekalzifizierung des PPP).

[0024] Wie Fig. 1 zeigt, nimmt die prokoagulatorische Aktivität von humanen glatten Gefäßmuskelzellen wenige Minuten nach Zugabe von $CaCl_2$ zu. Diese Zunahme ist bei Expression der inaktiven Kinase (sgk-MT) langsamer als

bei der Expression der normalen Kinase (sgk-WT). Die zusätzliche Verabreichung von Thrombin (Thr) führt erwartungsgemäß zu einer Beschleunigung der Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität. Auch dabei ist die Wirkung stärker und schneller in Zellen, welche die intakte Kinase exprimieren, als in Zellen, welche eine inaktive Mutante exprimieren. Zellen, welche intakte (Wildtyp) sgk Kinase exprimieren (sgk-WT) weisen zu jedem Zeitpunkt eine höhere prokoagulatorische Aktivität auf als Zellen, welche eine inaktive sgk Mutante exprimieren (sgk-MT), unabhängig davon, ob Thrombin dazugegeben (sgk-WT/Thr bzw. Sgk-MT/Thr) wurde oder nicht.

[0025] Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß eine Überexpression von intaktem sgk1 in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer gesteigerten koagulatorischen Aktivität führt. Durch die bekannt wichtige Rolle des TF bei verschiedenen Zellvorgängen zeigt dieses Ergebnis auch, daß eine Überaktivität der sgk1 bei einer gesteigerten Expression des Tissue Factors an der Zellmembran die Gerinnbarkeit des Blutes

fördern, die Anheftung von Tumorzellen mit folgender Metastasierung ermöglichen sowie die Angiogenese steigern kann. Umgekehrt würde dieser Mechanismus durch Unterdrückung der sgk1-Expression bzw. durch pharmakologische Hemmung der sgk1 unterdrückt werden.

5

Patentansprüche

1. Verwendung mindestens einer Substanz zum Nachweis der Expression und/oder Funktion von sgk1 in eukaryotischen Zellen, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF (Tissue Factor) im Zusammenhang stehen. 10
2. Verwendung mindestens eines Wirkstoffes zur Beeinflussung, insbesondere zur Inhibierung oder Aktivierung der Expression und/oder Funktion von sgk1 in eukaryotischen Zellen, zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen. 15
3. Verwendung mindestens eines Wirkstoffes zur Beeinflussung, insbesondere zur Inhibierung oder Aktivierung der Expression und/oder Funktion von sgk1 in eukaryotischen Zellen, zur Herstellung eines Medikamentes oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen. 20
4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff gegen sgk1 gerichtet ist. 25
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff gegen Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologische Vorläufer von sgk1 gerichtet ist. 30
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Kinase-Inhibitor, vorzugsweise Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. eines von deren Analoga, ist. 35
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid, kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion von sgk1 beeinflußt, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert. 40
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein "small molecular compound", vorzugsweise ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht (MG) < 1.000, ist. 45
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen, die insbesondere mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen, um Koagulopathien handelt. 50
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Koagulopathien um angeborene Koagulopathien handelt. 55
11. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Koagulopathien um erworbene Koagulopathien handelt.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen, die insbesondere mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen, um Angiopathien handelt. 60
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Angiopathien um angeborene Angiopathien handelt. 65
14. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekenn-

zeichnet, daß es sich bei den Angiopathien um erworbene Angiopathien handelt.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff zur Stimulierung oder Inhibierung der Angiogenese eingesetzt wird.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff zur Stimulierung oder Inhibierung der Wundheilung eingesetzt wird.
17. Diagnosekit, umfassend mindestens eine Substanz zum Nachweis von Expression und/oder Funktion von sgk1, zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer gestörten Aktivität von TF im Zusammenhang stehen.
18. Diagnosekit nach Anspruch 17 zur Diagnose von Erkrankungen, die mit einer Über- und/oder Unterfunktion von sgk1 verbunden sind.
19. Diagnosekit nach Anspruch 17 oder 18 zur Diagnose von Koagulopathien, Angiopathien und/oder Angiogenese-abhängigen Erkrankungen.
20. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffes, der die Expression und/oder Funktion von sgk1 beeinflußt, insbesondere inhibiert oder aktiviert, und ggf. einen pharmazeutischen Träger.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirkstoff um einen Kinase-Inhibitor, vorzugsweise um Staurosporin und/oder Chelerythrin bzw. eines von deren Analoga, handelt.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion von sgk1 beeinflußt, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert.
23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein "small molecular compound", vorzugsweise ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht (MG) < 1.000, ist.
24. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, umfassend eine wirksame Menge mindestens eines Wirkstoffes, der die Expression und/oder Funktion von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk1 beeinflußt, insbesondere inhibiert oder aktiviert, und ggf. einen pharmazeutischen Träger.
25. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Polynukleotid ist, welches ein Peptid, vorzugsweise ein Polypeptid kodiert, wobei dieses Peptid die Expression und/oder Funktion von Aktivatoren, Inhibitoren, Regulatoren und/oder biologischen Vorläufern von sgk1 beeinflußt, vorzugsweise inhibiert oder aktiviert.
26. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein "small molecular compound", vorzugsweise ein "small molecular compound" mit einem Molekulargewicht (MG) < 1.000, ist.

